

械に囲まれ、青木研の学生らと格闘しながらアフリカツメガエルの胚やショウジョウバエの蛹、大腸菌などのイメージングを試みた。X線吸収端微細構造(X-ray absorption near edge structure; XANES)の差分解析によるアフリカツメガエル胚内の元素分析や、金コロイド標識抗体を用いた特定蛋白質の画像化などに成功し、修士論文としてまとめることができた。しかし、2年の研究期間で到達できたのは、“固定した(死んだ)”アフリカツメガエル胚の断層撮影¹⁾がやっとであり、分子レベルで生きた試料のなかの現象を観る夢は実現しなかった。とはいえ、そのあいだに学んだ光学の知識がいまごろ役に立っていると思うと、無駄な2年間ではなかったといえる。

3. 分子生物学的手法の修得

そのうち、上野博士からの“永井さー、おまえのやろうとしていることは15年早いんだよ。自分のラボをもってからはじめても遅くない。いまはもうちょっと現実をみつめた研究をしておいたほうがいいぞ”との言葉に、“なんで10年や100年やなくて15年やねん?”と思いつつも(心にもなく)改心し、博士課程では遅ればせながら分子生物学なるものをしっかり身につけようと、東京大学医科学研究所の御子柴克彦博士に師事した。御子柴博士は、当時、3カ所(白金、目黒、筑波)で研究室を構えていた。筆者は理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センターで神経発生にかかわる研究を行なうことになり、ジंकフィンガー型転写因子Zicの相同遺伝子クローニング²⁾、発現解析³⁾、ノックアウトマウスの作製と解析⁴⁾を行ない、分子生物学のイロハの習得に余念がなかった。

バイオイメージングとは無縁な研究生生活を送っていたところ、筆者の心を揺るがす衝撃的な論文があいついで発表された。1994年のGFP(green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白質)異所性発現⁵⁾、1995年の全反射顕微鏡による1分子蛍光イメージング⁶⁾、1997年の蛋白質性Ca²⁺指示薬の開発⁷⁾である。早速、GFP遺伝子をもって大腸菌に発現させるもたいして光らず、“なんやこんなもんかいな?”と失望した記憶がある。蛋白質性Ca²⁺指示薬の論文は、同じ御子柴研究室の宮脇敦史博士(当時 東京大学医科学研究所、現 理化学研究所脳科学総合研究センター)が留学先の米国California大学San Diego校Tsien研究室で行なった研究で、*Nature*誌に発表されたため研究室内で大きな話題

になった[編集部注: Roger Y. Tsien博士は、GFPの発見と開発により、2008年ノーベル化学賞を受賞した。本誌今月号p.78、宮脇敦史、〈Laureate〉2008年ノーベル化学賞: GFP史話も参照されたい]。時代は確実に自らが卒業研究のときに考えていた方向にむかっていると、このとき確信した。

4. 宮脇博士との邂逅

1998年、博士号を無事に取得するのとときを同じくして、宮脇博士が米国から御子柴研究室に戻ってきた。これ幸いと、海外留学を考えていた筆者はバイオイメージング関連の研究室の情報を聞くべく、“日本語の”電子メールで連絡をとったところ、“Why don't you come here on coming Saturday?…”と、すべて英語で書かれた返事が返ってきた。“なんやこのおっさん? アメリカかぶれて日本語でけんようになったんか?”と訝しがりつつも、東京大学医科学研究所のオフィスを訪れた。会って話をはじめると、予想に反して日本語は(筆者より)達者で、すっかり疑念は晴れた。筆者が当時もっていた組織特異的な細胞破壊法のアイデアにはじまり、発生学、散逸構造論やX線顕微鏡の生物応用、バイオイメージング研究の動向、それに、今後有望な世界の研究室など、多岐にわたって話しあった。どの話題にも食いついてきて的確なコメントを返し、かつ、即興の実験アイデアをポンポン出すところから、並の頭脳ではないなと感心していると、“今度の春、理化学研究所で研究室を立ち上げるんだけど、いっしょに研究しない? 海外留学したってたいしたことできないけど、僕のところにすればおもしろい研究ができるよ”と予想だにしない言葉もらった。“海外の留学先で*Nature*だしとるくせに、なにぬかしとんねん!”と内心では突っ込みつつ、あくまでも海外留学が頭にあって筆者はおおいに迷った。こういうときこそボスに相談するものだろうと、筑波に帰ってから御子柴博士に電話した。しかし、“宮脇のところに行ったら研究室の立ち上げからはじまるし、FRETはトリッキーだから間違いないく4年は論文でないぞ!”と脅され、迷いは払拭されるどころか、ますます深まってしまった。そのあともあれこれ悩んだが、一向に降があかない。考えるだけ時間の無駄と思い、数日後には“えーい、こうなったらいちかばちかだ!”と宮脇研究室への“留学”を決心した。それから3カ月後、筆者は住み慣れた茨城の地を離れ、板橋に居を移し、

1999年3月下旬に理化学研究所本所の脳科学総合研究センターでの研究をスタートした。以下は、それからはじまるプローブ開発ストーリーである。

II. Ca²⁺指示薬 Pericamの開発秘話

1. 宮脇研究室事始め

いまは伐採されて一部を残すのみとなってしまったが、当時の理化学研究所本所・研究本館の南側はさながら桜林となっており、気の早いグループが五分咲きの桜をまえに花見を楽しんだりしていた。その桜林の南側にひととき大きな建物が建設中であった。その建物こそが、研究室が入ることになっている脳科学総合研究センター中央棟であった。建物ができていないので、もちろん実験室はまだなく、東棟の地下1階の部屋の一角を間借りしていた。実験ができないし、何をテーマに研究するかも決まっていなかったのので、とにかくGFP研究の現状を把握しようと思い、せっせと関係する論文、総説、教科書を読みまくった。また、週に一度、ラボメンバー（ポストドク5人、テクニカルスタッフ3人）が集合して、宮脇博士の講義を聴講した。蛍光の理論、GFP、FRET、OCT、ビーコン、2光子励起、レシオイメージング、緩和法、ケージド化合物など、宮脇博士の気のおもむくままの講義であったが、どれも非常におもしろかった。このようにピペットマンを握らない生活が3カ月

も続いた。実験をしないから、なにもデータはでない。溜まるのは知識だけ。しかし、ここで蓄積した知識はそのうち多いに役立つことになった。

2. 研究テーマの決定

6月に入って中央棟の1期工事が完成し、ようやく研究室のセットアップが開始された。什器が入り、実験台が入り、測定機器が入り、じわじわと研究室らしくなっていく。そのころには、筆者の最初の研究テーマが決まりつつあった。“GFPの円順列変異体を利用したCa²⁺指示薬の開発”と“活性化型カスパーゼ3による組織特異的な細胞破壊法の開発”の2つである。それぞれ、宮脇博士と筆者とが提案したものであった。本稿は蛍光プローブ開発に関するものなので、後者は割愛し前者にしぼって話を進める。

円順列変異とは、蛋白質の内部の適当な位置で切断し、N末端とC末端とをひっくり返してつなげる変異のことである(図1a)。すでに宮脇博士の留学先だったTsien研究室では、GFP円順列変異体の作製に関してプロジェクトが進行しているとのことだったので、同じことを行なうことへの不安がないわけではなかった。しかしながら、今回のプロジェクトではそのGFP円順列変異体をさらに改変してCa²⁺感受性をもたせようというもので、Tsienからは了承を得ているらしい。FRETを応用したCa²⁺指示薬Cameleonとは異なる方法で指示薬を作製するという目論見である。Ca²⁺

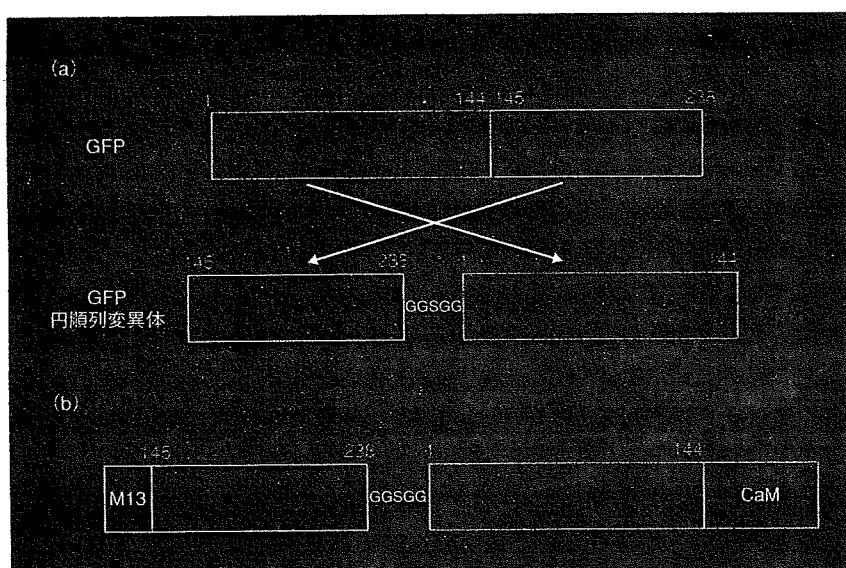


図1 GFPの円順列変異体とPericamの構造
(a) PericamのもととなったGFP円順列変異体。
(b) Pericamの構造。カルモジュリン(CaM)ペプチドとM13ペプチドをGFP円順列変異体のN末端とC末端とに連結することでCa²⁺感受性が生じる。

センサーとしては、Cameleonと同様、カルモジュリン (calmodulin; CaM) ペプチドとM13ペプチドを利用し、それぞれをGFP円順列変異体のN末端とC末端とに連結することでCa²⁺感受性が生まれる“だろう”というアイデアであった(図1b)。GFP初心者の筆者にはその理論背景がまったくわからなかったので、宮脇博士に質問してみた。返答は“円順列変異でGFPのβバレル構造に口を設ける。上唇と下唇の部分にカルモジュリンとM13をつなげるとCa²⁺依存的な相互作用でその口が塞がれてしまう。そうすると蛍光特性が変わるんだ”というものであった(図2)。文字どおり“煙に巻く”ような、よくわからない説明であった。でも、やってみるとわからんし、やっているうちに頭がついてくるようになる、というのが筆者の信条なので、理解が不完全なまま遺伝子の構築にとりかかった。

3. 研究開始

6月24日、研究開始。まずは、Cameleon (YC2.1) を鋳型にカルモジュリンとM13をPCRで増やして、大腸菌発現ベクターに挿入した。並行して、同じ研究室の沢野朝子さんが、GFPの各波長変異体6種類を用いて145番目のアミノ酸残基を新たなN末端とする円順列変異体(コードネーム: p54A1, p54B1, p54C1; p54D1, p54E1, p54G1)を作製した。それらをもって、カルモジュリンとM13のあいだに挿入し、コードネームCM2-p54X (X=A, B, C, D, E, G)と名づけた遺伝子を構築した。それらが大腸菌に形質転換して、数日後、コロニーがたくさんでいる寒天プレートに紫外線イルミネーターのうえに置くと、3種類のコンストラクトがうっすら光っていた。しかも、それぞれ違う色を発していた。博士課程のときに野生型GFPを発現させて失望したときは異なり、ある種の感動を覚え、“うわー、めっちゃすげー”と唸っていたのはいうまでもない。気をよくして、蛍光性コロニーをピックアップして大量培養したのち、蛋白質を精製した。やはり、波長変異体ごとに溶液の色づきが異なり、CM2-p54C > CM2-p54B > CM2-p54Dの順番で溶液の色は濃かった。それぞれECFP (enhanced cyan fluorescent protein), EGFP (enhanced green fluorescence protein), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein)の由来である。残りは色がついていない。早速、蛍光分光光度計で、Ca²⁺があるときとないときの蛍光スペクトルを測定した。ところが…まったく変化がない。

一気に落胆である。“どだいそんな簡単にアイデアが実現できるわけないわな。このプロジェクトは中止か? いや待てよ。一応ちゃんと蛋白質ができていないかSDS-PAGEで調べておこう”と気を取り直し、調べてみると…カルモジュリンがちぎれた蛋白質ができていたことがわかった。Ca²⁺に反応しないのは当たり前である。

そこで、培養温度を変えたり、フラスコの回転数を変えたり、IPTGの濃度を変えたりと、蛋白質を発現させる条件をいろいろ検討してみたが、やはり結果は同じ。“ほんだからカルモジュリンとM13をひっくり返したらどうだろう?”と、早速コンストラクト(MC2-p54X)を作製して蛋白質を精製し、蛍光測定した。すると、Ca²⁺の有無でちゃんと蛍光強度が変化するではないか! とくに、MC2-p54CとMC2-p54Dが大きな変化(それぞれ、1.6倍と2.8倍)を示した。

ときは7月21日。研究開始からわずか1カ月でプレリミナリーなデータをとることができた。嬉しさのあまり宮脇博士に報告すると、たいして嬉しくなさそうに“生きた細胞のなかで変化がみられないとだめだね”と労いの言葉もなし。“おっしゃー。もっとええデータとったるでえー”と自らを励まし、MC2-p54CとMC2-p54Dを哺乳類の培養細胞に発現させるべく、遺伝子のサブクローニングを開始した。遺伝子構築が終了し、いよいよイメージング実験である。顕微鏡は研究室に入ったばかりのオリンパス社IX-70で、Roper Scientific社のMicroMaxカメラがついていた。また、画像取得やデバイス制御用にMolecular Devices社のMetaFluorがインストールされていた。どれもはじめて使用するもので、要領を得るまではたいへんだった。しかし、何度かの試行錯誤ののち、8月23日にポジティブデータを得ることに成功した。MC2-p54CまたはMC2-p54Dを発現するHeLa細胞にヒスタミン刺激をすると、いずれも蛍光強度が明らかに上昇した。MC2-p54Dにいたっては、蛍光強度の明滅っぽいものまでみられた。もしかしたらCa²⁺振動がみえているのではと、もう喜びを通り越して感動を覚えていた。当然、宮脇博士にすぐさま報告。すると、“これじゃーまだまだ。10倍くらいシグナルが変化しないと駄目だね。fluo-3なんて100倍以上も変化するよ”だってさ…。確かに、蛍光強度の変化はわずかだったけど、もうちょっと喜んでくれてもええんちゃうん…。

そのときは憤りを感じたが、頭が単純なのだろうか、翌

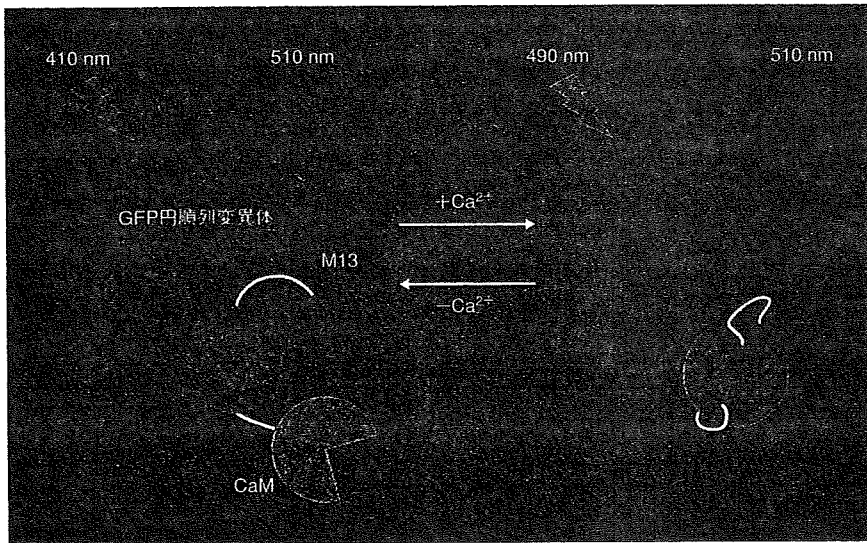


図2 Pericamの動作機構

円順列変異でGFPのβバレル構造に口を設け、上唇と下唇の部分にカルモジュリン(CaM)ペプチドとM13ペプチドをつなげる。Ca²⁺依存的な相互作用でその口が塞がれると、蛍光特性が変わる。

Hにはそのことをすっかり忘れてつぎの作戦開始。YFP円順列変異体内のリンカー配列を変えたり、より明るく光るようにするためにフォールディング変異を導入したり、YFP円順列変異体の発色団と静電相互作用するアミノ酸残基に変異を導入したりと、当時で考えられるあらゆることを試した。そのあいだに、Tsienの研究室からGFPの円順列変異体に関する論文がでた⁸⁾。そこには、GFP内への受容体挿入によるCa²⁺指示薬CaMgalooの開発も記載されており、筆者らの研究と内容が重複する部分も多かったが、明らかに筆者らの開発しているものとは設計思想が異なっているので安堵した。しかし、Tsien研究室でも同じことをしているのではないかとの不安は払拭できなかった。そんな不安を取り除くには、がむしゃらに酒を飲むか実験を行なうしかなかった。もちろん後者を選び、がむしゃらにたくさん遺伝子構築を行なった。その甲斐あって、とうとう10月16日、Ca²⁺結合により蛍光強度が8倍変化するMC2-p54DH1を作製することに成功した。これは、MC2-p54DH1に4つのアミノ酸変異H148D, V163A, S175G, Y203Hを導入したものであった。細胞内での応答も十分に大きく、Ca²⁺振動もしっかりとらえることができた。fluo-3ほどではないが、十分、実用に耐えうる性能をもっているといっ

てよかった。
 今度こそは！と意気込んで報告すると、“よっしゃ！”とようやくポジティブな反応が得られ、名前をつけようということになった。研究室のメンバー全員にアイデアを募集

し、ホワイトボードに名前を案をどんどん記入して貰ってもらった。“がまぐち”“入れ歯”“食虫植物”“ディオネア”“ペリカン”など、さまざまな案が出た。実は、筆者が出した案は“ディオネア”で、これは食虫植物の学名である。MC2-p54DH1がCa²⁺と結合して光るようすが、葉を閉じてハエを捕らえて元気になるディオネアの姿を彷彿させたからである。2週間ほどの募集期間ののち、宮脇博士がどれにするかをラボミーティングで決定した。20以上の案のなかから選ばれたのは“ペリカン”であった。正確には、Pericam(ペリカム)である。permutation(順列変異)のperとカルモジュリンの略称CaMをあわせた造語で、蛋白質の特徴をよく体現した名称であること、かつ、ペリカンがくちばしを開閉するようすが指示薬のCa²⁺結合にともなう立体構造変化を連想させるという点が評価されたい。このPericamもまんざら悪くはないと思った。しかし、MC2-p54DH1の生みの親としては、自分の考えた名前を採用してもらいたかった。この経験が、これ以降に開発するVenus⁹⁾やYC3.60¹⁰⁾、Phamret¹¹⁾などの命名を大きく左右していく。それらの開発および命名秘話はまた別の機会に、

4. 生みの苦しみ

さて、名前もついたので論文化もそろそろではないかと思ひ宮脇博士に尋ねると、“レシオイメージングが可能な指示薬ができあがるまでは論文になんてまとめられないよ。だって、1波長励起1波長測光型の指示薬だと信頼のおけるイ

イメージングはできないからね、動いたり形が変わったりする試料を観察する場合は、とくに「そうだよ」とのこと。確かにそのとおりだと思い、すぐさまつぎのステップに突入した。ここまでが順調だったこともあり、またバリバリやればすぐにレシオメトリックな指示薬は開発できるだろうと楽観していた。しかし、この期待は見事に外れた。10カ月にわたる生みの苦しみがはじまった。

EYFPがもつ波長400 nmあたりの無蛍光性吸収を蛍光性吸収にすればよいのではと思い、203番目のアミノ酸残基をスレオニンに変えてみたがだめだった。それでは、円順列変異の鋳型を変えてみよう、EYFPではなく ratiometric phluorin¹²⁾ を用いてみたが今度はまったく光らない。蛋白質がちゃんとフォールディングされていないのではないかと考え、F99SやM153Tなどのフォールディング変異を挿入したり、円順列変異内のリンカー配列の最適化を行ったり、円順列変異体とカルモジュリンやM13とのあいだのリンカー配列の最適化を行ったり、気がつくにつれて構築した遺伝子の総数はすでに100個をこえていた。さまざまな文献を読んで得た知識をもとにあらゆる試行を行なったが、うまくいかなかった。過去のデータや理論から結果を予測して行なう実験なんて、うまくいくことのほうが少ない、と考えるようになったのはこのころである。

頭でっかち実験はやめてつぎにとった戦略は、「スペクトルに変化をあたえそうなアミノ酸残基にあらゆる変異を導入して、目的のものをスクリーニングする」だった。148番目と203番目のアミノ酸残基をターゲットとして選んだ。部位特異的ランダム変異導入を行ない、蛋白質を大腸菌に発現させて精製し、ひとつひとつ蛍光・励起スペクトルを測定していった。その結果、148番目と203番目のアミノ酸残基がそれぞれアスパラギン酸とフェニルアラニンになると励起スペクトルが二峰性になり、しかも、Ca²⁺の濃度によってその強度比がレシプロカルに変化することがわかった。しかし、YP32DF0-17と名づけられたこのコンストラクトは、残念なことに、37℃ではあまり明るく光らなかった。そこで、エラー誘発PCRによってYP32DF0-17の全長にランダム変異を導入して大腸菌に発現させ、37℃の培養条件下で明るく光るコロニーをピックアップした。遺伝子を抽出して配列を調べると46番目のフェニルアラニン残基がロイシン残基に変異していることがわかった。このYP32DF0-17-F46LをHeLa細胞に発現させると十分に明るく光り、しか

も、念願のレシオイメージングを行なうことにも成功した。さらに、YP32DF0-17-F46Lの148番目のアミノ酸残基をスレオニンに置換したもの(YP32TF0-17-F46L)はCa²⁺に結合すると蛍光強度が減少するという特性をもつことや、初代Pericamの円順列変異体内のリンカー部分で切り離したもの(M13-pericam-Nとpericam-C-CaM)を同時に発現させるとしっかりCa²⁺応答がみられることなども、同時期にぞくぞくと明らかになった。さまざまな特性をもつコンストラクトができたので、初代Pericamをflash-pericam, YP32DF0-17-F46Lをratiometric-pericam, YP32TF0-17-F46Lをinverse-pericam, M13-pericam-Nとpericam-C-CaMをsplit pericamと命名した。

ここまでくれば宮脇博士も納得し、いよいよ論文化である。細胞やミトコンドリアなどの細胞内小器官におけるCa²⁺イメージングのデータなどをくわえて、11月6日に*Nature Biotechnology*誌に投稿した。ところが、11月13日にリジェクトの通知が届いた。理由は以下のとおりであった。「I am concerned that genetically encoded fluorescent indicators for calcium based on GFP have been previously described, so that this paper lacks sufficient conceptual novelty for our readership...」Cameleonと発想が違わないと判断されたい(とこのときは考えたが、そうでないことはすぐに判明する)。そこで、つぎこそはと*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*誌に投稿した。幸い、今度はレビューにまわり、2名のレビューアーからマイナーコメントがついた。それに答えて年末の12月26日に郵送し、12月30日にアクセプトされた。ようやく苦勞が報われ、筆者の20世紀は幕を閉じた。

5. 衝撃

年が明けるとともに21世紀のはじまりである。初詣をすませ、恒例のおみくじを引いた。幸運にも大吉が出た。21世紀は筆者にとってよい世紀になることを予感させ胸をおどらせていた。しかし、2月に衝撃が走った。Pericamと同じ発想に基づくCa²⁺指示薬の開発にかかわる論文が、*Nature Biotechnology*誌に掲載されたのである¹³⁾。指示薬名はG-CaMP。著者は宮脇博士のよく知っている人とのことで、以前に2回ほど研究会で会ってPericamのことについて議論したことがあったらしい。その論文のアクセプトされた日は11月20日。Pericamの論文が*Nature Biotechnology*誌に

リジェクトされてから1週間後である。EditorはCameleonではなく、このG-CaMPとコンセプトが変わらないと聞いていたのだ。まさか競争相手はいないだろうと思っていたので、2人でびっくりしていた。“灯台もと暗し”とはまさにこのことである。その翌月、Pericamの論文がようやく掲載された¹⁴⁾。驚いたことに、すぐさまScience誌のSenior Editorからメールがあり、“Editors Choice”で紹介したいとのこと。それ用の図を作成して送った。しばらくすると今度は、Trends in Cell Biology誌のDeputy Editorからメールがあり、“short news”として掲載させてほしいとのこと。またまたそれ用のデータをとって送付。そのあと、多くの遺伝子リクエストが殺到した。Pericamの反響の大きさに、正直、驚いた。こんなに注目されるのであれば、最初からScience誌などに投稿すればよかったと後悔した。が、あとの祭りである。

おわりに

幸いにも御子柴博士の予想はずれ、官協研究室での研究開始後1年半で1報目の論文をだすことができた。“鈍才は頭ではなく、身体を使うこと”の信条が筆者のなかに生まれたのはこの研究によってである。ただし、鈍才は鈍才なりにおもしろいアイデアを発想することは重要で、そのためには広範な知識が必要である。学部、修士、博士、ポストドクと研究室を変え、そのたびに研究テーマもがらりと変えてきたが、そのことで得られた知識は今の筆者の宝である。豊富な知識と頑健な身体で“考えるアリ”になりきることが漠進的に研究を進める秘訣である。ただし、実験ばかりやってもよい研究ができるわけではなく、アフター7はいろいろな人と飲みながらディスカッションすることで、“アホ”な発想力も養わないといけない。

実は、Pericamの論文が出版されたころ2匹目のドジョウがすでに釣れていた。高効率に発光構造をとる黄色蛍光蛋白質Venusである。PericamとVenusの開発で培った

ノウハウを用いて“光らない”蛍光蛋白質を開発し、生物研究へ応用していくアイデアも生まれていた。まさに、いまに続くアイデアの“インフレスパイラル”がはじまろうとしていた。修士課程のときに上野博士に言われた“15年後”は今年である。そろそろX線顕微鏡関係の研究を再開しようか。



- 1) Aoki, S. et al: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 33, 556-558 (1994)
- 2) Aruga, J. et al: *J. Biol. Chem.*, 271, 1043-1047 (1996)
- 3) Nagai, T. et al: *Dev. Biol.*, 182, 299-313 (1997)
- 4) Nagai, T. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1618-1623 (2000)
- 5) Chalfie, M. et al: *Science*, 263, 802-805 (1994)
- 6) Funatsu, T. et al: *Nature*, 374, 555-559 (1995)
- 7) Miyawaki, A. et al: *Nature*, 388, 882-887 (1997)
- 8) Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11241-11246 (1999)
- 9) Nagai, T. et al: *Nature Biotechnol.*, 20, 87-90 (2002)
- 10) Nagai, T. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559 (2004)
- 11) Matsuda, T., Miyawaki, A., Nagai, T.: *Nature Methods*, 5, 339-345 (2008)
- 12) Miesenböck, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E.: *Nature*, 394, 192-195 (1998)
- 13) Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K.: *Nature Biotechnol.*, 19, 137-141 (2001)
- 14) Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., Miyawaki, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 3197-3202 (2001)

永井健治

略歴：1998年 東京大学大学院医学系研究科博士課程 修了，同年 理化学研究所 基礎科学特別研究員，2001年 科学技術振興機構 さきがけ21研究員，2005年より北海道大学電子科学研究所 教授。

研究テーマ：バイオイメージング技術開発。

関心事：健康的なダイエット。

EXPERIMENTAL MEDICINE

実験医学  増刊

別 刷

 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail : eigyo@yodosha.co.jp

URL : <http://www.yodosha.co.jp/>

2. 光変換蛍光タンパク質を用いた 生体分子の動態解析法

永井健治, 松田知己

紫外線などの刺激光を照射することで蛍光特性が変化する光変換蛍光タンパク質は特定の細胞や細胞内小器官,あるいはタンパク質を高いコントラストで観察するためのツールとして需要が高まりつつある。本稿では最近われわれが開発した共鳴エネルギー移動を光変換原理とする新しい光変換蛍光タンパク質 Phamret および光変換蛍光タンパク質を利用したタンパク質拡散定量法 FDAP について解説し,従来の光変換蛍光タンパク質との違いや特徴を議論する。

はじめに

多数の生体分子間相互作用によって形成されるネットワークを記述し,生命現象を生体分子システムの機能創発として理解しようとするシステム生物学が注目されつつある。システム生物学の中でも特にインタラクトームとよばれるものはいわばそれぞれの生体分子を電子回路の各構成要素(トランジスターや抵抗な

ど)として捉え,その電子回路“的”なものがどのように機能するのかを計算機シミュレーションによって理解しようとする学問である。このシミュレーションに必要なパラメーターは生体分子の濃度と反応速度定数の2つであることが多い。このことは,生体分子システムの動作律速が“反応”にあるという前提の上で成り立つ。ところが,電子回路の各構成要素と異なり,生体分子は基板上に固定されておらず,ほとんどの分子が細胞内を単純拡散などによって動き回っているので,上流のシグナルを受け取った分子が細胞内のかなり離れた場所に移動して下流の分子と反応をする場合には,必ずしも“反応”が律速になるわけではなく,“分子の移動時間”が律速になることもありうる。したがって,より正確かつ厳密に生体システムの機能を予測するためには,分子の移動時間に関する例えば分子拡散係数などのパラメーターを数理モデルに組込んで計算機シミュレーションしなければならない。しかしながら,現状のほぼすべてのシステム生物学的分子ネットワークシミュレーションは生化学実験で得られた反応速度定数のみを利用しており,分子拡散係数まで考慮に入れたものはほとんど見かけない。なぜ

[キーワード&略語]

蛍光顕微鏡, 光変換蛍光タンパク質, 拡散係数

FCS: fluorescence correlation spectroscopy
(蛍光相関分光)

FDAP: fluorescent decay after
photostimulation (タンパク質拡散定量法)

FRAP: fluorescence recovery after
photobleaching (光退色後蛍光回復)

FRET: fluorescence resonance energy transfer
(蛍光共鳴エネルギー移動)

mSECFP: monomeric super enhanced cyan
fluorescent protein

PA-GEP: photoactivatable green fluorescent
protein

SMT: single molecule tracking (1分子追跡)

A novel method to determine diffusion coefficient of biomolecules with fluorescence decay after photostimulation of photoconvertible fluorescent protein

Takeharu Nagai/Tomoki Matsuda: Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University (北海道大学電子科学研究所)

か？ 答えは簡単である。細胞内において各生体分子がどのように動き回っているのかに関する定性的・定量的な情報がまだまだ足りないからである。

① 従来の分子動態解析技術

とはいえ、これまでに分子動態を解析する方法がなかった訳ではない。例えばFCS法^{*1}やSMT法^{*2}などの方法を用いれば分子動態の解析は可能である。にもかかわらず、これらの技術を利用して分子動態を定量的に解析した論文の数は依然少ない。いずれの技術も数式や光学系に不慣れなことが多い生物系研究者にとってはとっつきにくいというのが大きな理由であろう。一方、FRAP（光退色後蛍光回復）法^{*3}はその簡便さから、比較的多くの生物研究者に抵抗感なく利用されている。昨今のレーザー共焦点顕微鏡にFRAP実験を行うためのシステムがすでにインストールされているということも一因かも知れない。しかし、ボタンを押せばFRAP解析が完了してしまうという簡便さゆえに、多くの研究者はFRAPの原理、理論、特性を十分理解することなく使用しているように見受けられる。例えば、“蛍光分子を光退色している時間に分子が動かない”ことを前提にFRAPの計算式は構築されているが、拡散係数が $10\ \mu\text{m}^2/\text{秒}$ もある分子であれば、その前提が崩れることは簡単な計算から明らかで

ある。また、蛍光分子を速やかに光退色させるのに要するレーザーのパワー密度は $10\text{W}/\text{cm}^2$ 以上もあり、どんなに光耐性を有する細胞に対しても、光損傷を無視することはできない。さらに、FRAP法は光退色した領域への蛍光分子の流入を測定するため、ある領域にある分子が細胞内のどこまで拡散することが可能かどうかを調べることができないという問題点や、そもそも光退色した分子の動態を直接解析できないなどの欠点もあった。

これらのさまざまな問題点はPA-GFP⁴⁾の登場によってある程度解決されたかにみえる。PA-GFPは $1\text{W}/\text{cm}^2$ 以下の紫（外）光を短時間（ミリ秒以下）照射するだけで活性化し、蛍光を発するようになる。したがって、光毒性の軽減のみならず、FRAPでは困難な速い拡散の解析が可能となり、しかも光刺激した領域に存在していたタンパク質が細胞内のどこに移動していくのかを観察することもできるようになった。唯一の難点と言えば、光活性化前のPA-GFPは無蛍光性であるため、PA-GFPを発現している細胞を探すのが少々大変であるという点であろう。そこで、光刺激前から蛍光性があり、光刺激によって蛍光波長が変化するKaede⁵⁾やEosFP⁶⁾、Dendra⁷⁾などの光変換蛍光タンパク質⁸⁾が俄然注目されるわけだが、これらも多量体形成、 37°C での成熟効率が悪い、光変換に10ミリ秒程度の時間がかかるなど問題点が多かった。さらに、従来のいずれの光変換蛍光タンパク質も光変換に伴い、蛍光スペクトルのみならず、吸収スペクトルも変化するため、その観察には2波長励起2波長測光を必要とする。細胞内での速い分子動態を観察する際に2波長の蛍光像をフィルターを交換しながら交互に取得すると2色の蛍光画像の間の時間的ずれが問題となり、たとえレーザー共焦点顕微鏡により2波長同時励起・同時蛍光測定を行ったとしても、完全には補正できない色収差が原因で励起の空間一緻性は達成できない。そもそも2波長で励起するため、1波長励起に比べ励起光の強度が必然的に高くなってしまい、プローブの光退色や細胞の光損傷の度合いが増加してしまう等々、解決されなければならない技術的課題が山積みであった。

② Phamret の開発

このような数多くの問題点を解決するべく、われわ

※1 FCS (蛍光相関分光) 法

微小領域内への分子の出入りによって引き起こされる蛍光強度揺らぎの自己相関から分子の拡散係数を解析する方法である。FCS法では、 $10\ \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以上の速い分子動態の解析が可能であるが、 $0.1\ \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 程度以下の遅い動きを解析することは困難である。

※2 SMT (1分子追跡) 法

蛍光1分子の動きをビデオレート(30fps)程度で追跡し、一定時間後の原点からの距離の2乗を各時間にわたって平均した“平均2乗変位”を求めることで拡散定数を解析する方法である。微弱な1分子蛍光シグナルをコントラスト良く捉えるには30fps程度が限界であり、したがって $1\ \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも速く拡散する分子は追跡ができず解析が難しい。

※3 FRAP (光退色後蛍光回復) 法

微小空間内の蛍光タンパク質を強い光を照射して光退色させた後に、その領域に流入する蛍光分子によって引き起こされる蛍光強度の回復を測定・解析する方法である^{15) 16)}。この方法では、 $10\ \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも遅い動きの測定については信頼性が高く、かつ動かない分子の割合を求めることもできるが、光退色に要する程度の時間(10~100ミリ秒)の間に素早く拡散してしまう分子の測定は難しい。

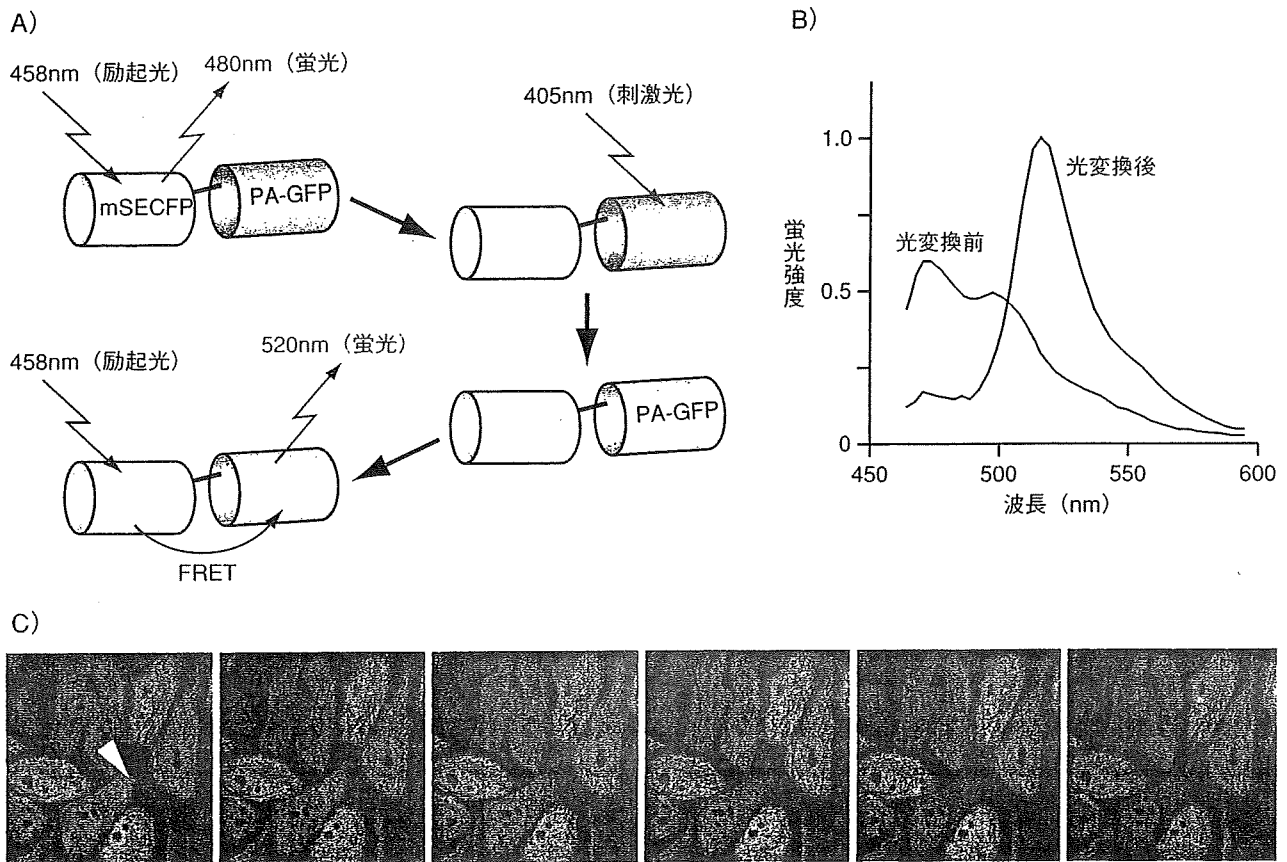



図1 光変換蛍光タンパク質 Phamret 

A) Phamretの構造と光変換の原理. B) 光変換前後のPhamretの蛍光スペクトル. 458nmで励起して測定. C) HeLa細胞にPhamretを発現させ、白矢頭の領域に405nmのレーザー光を連続照射してPhamretを光変換し、細胞内を拡散していく模様を捉えたもの(文献9より転載)

これは1波長励起2波長測光型の単量体型光変換蛍光タンパク質の開発に取り組んだ⁹⁾. われわれが取ったアプローチはFRETの利用である. PA-GFPをFRETアクセプターとして利用し、適当なFRETドナーと連結すれば、光刺激前はドナー蛍光が、刺激後はアクセプター蛍光が観察されるはずであると考えた(図1A). そこで、シアン蛍光タンパク質の1つであるmSECFP(monomeric super enhanced cyan fluorescent protein)をFRETドナーとしてPA-GFPとタンデムに連結した. mSECFPを用いた理由は、その蛍光スペクトルが活性化型PA-GFPの吸収スペクトルと大きくオーバーラップするからである. また、光刺激によって大きく蛍光色が変わるようにするため、mSECFPから活性化型PA-GFPへのFRETが効率よく起こるように、mSECFPのC末端11アミノ酸とPA-GFPのN末端3アミノ酸を削って連結した. 期待

通り、この融合タンパク質は光刺激前後で458nm励起による蛍光色がシアン色から緑色へと変化した(図1B). 光活性化に依存した共鳴エネルギー移動により蛍光色が変わる原理を用いているこの融合タンパク質をわれわれはPhamret(photoactivation-mediated resonance energy transfer)と命名した.

Phamretを哺乳類培養細胞に発現させると細胞質と核に凝集塊をつくることなく均一に分布し試験管内と同様405nmの光刺激によって蛍光色が変わった(図1C). いくつかの光変換蛍光タンパク質で問題となっている多量体形成の可能性に関して調べるため、大腸菌で発現させた精製リコンビナントタンパク質や哺乳類培養細胞に発現させたタンパク質をゲル濾過カラムにかけて解析したところ、単量体相当の位置にシングルピークで溶出されることから、単量体として機能することが示された. 確かに、さまざまなタンパク質

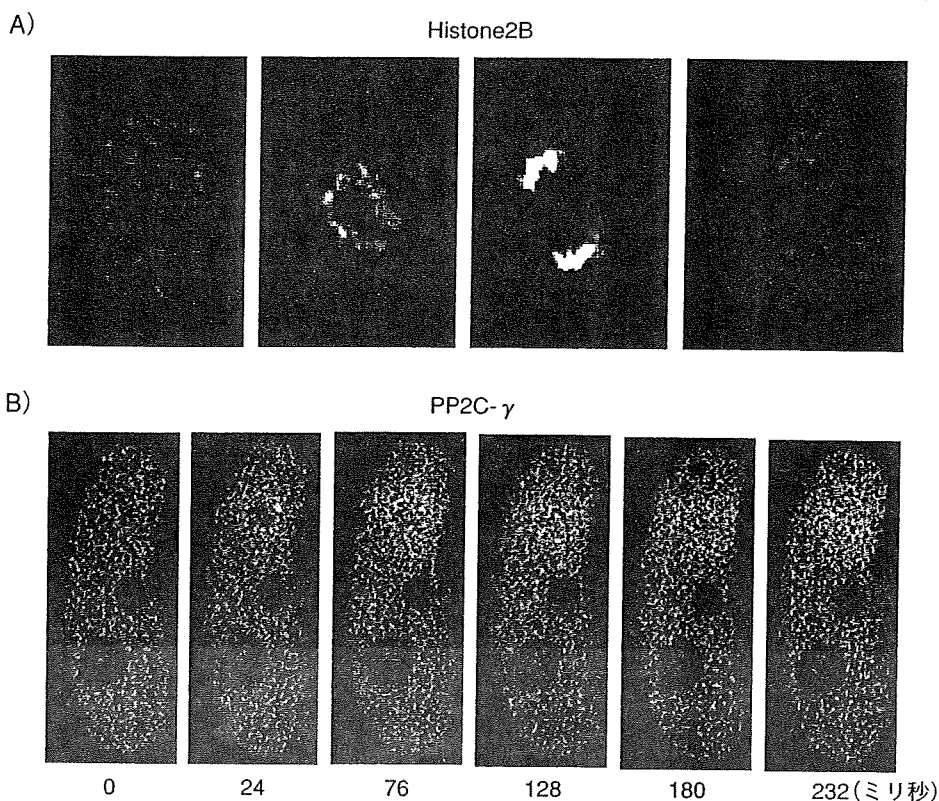


図2 Phamretの光変換によるタンパク質の動態解析 **MOVIE**
 A) H2B-Phamretを細胞分裂前に核の下半球のみ光変換させてタイムラプスイメージングを行った例。シアン蛍光（水色）と緑色蛍光（赤色）を重ね合わせて表示。B) 核内に発現するPP2C γ -Phamretの一部を光変換させて42Hzで画像取得を行った。パネル下に示す時間におけるPA-GFP/CFPのレシオ画像を表示（文献9より転載）

と融合させて細胞に発現させると、融合したタンパク質と同じパターンで発現し、細胞に際だった異常がみられることもなかった。

PhamretのC末端側にクロマチン構成タンパク質の1つであるHistone2Bを融合（H2B-Phamret）させてHeLa細胞内で発現させた。核内に発現したH2B-Phamretを細胞分裂前に半円状に光変換させてタイムラプスイメージングを行ったところ、分裂後においても核の半分の領域に光変換したH2B-Phamretが分布しているパターンが保存される様子を観察することができた（図2A）。また、核内に存在するセリン/スレオニンホスファターゼPP2C γ をPhamretのC末端側に融合（PP2C γ -Phamret）してHeLa細胞内に発現させ、核内の一部を光変換させたところ、PP2C γ -Phamretが素早く拡散する模様を捉えることができた。同じ核内因子でも、さまざまな動態が存在することがわかる（図2B）。

3 FDAP法の開発

Phamretなどの光変換タンパク質はタンパク質動態の可視化のみならずタンパク質拡散係数を求める定量的解析にも用いることができる。この場合、FRAP法とは逆に光刺激によって増大した蛍光強度が拡散によってどの程度の時間で減衰していくのかを解析する。光変換の量子効率が光退色に比べて大きいため、弱い刺激光（ $< 1 \text{ W/cm}^2$ ）を短時間照射することで光変換を達成することができる。したがって、細胞に優しい測定法であるだけでなく、FRAP法が苦手としていた速い分子拡散の定量測定が可能になる。しかしながら、これまで光変換後の蛍光強度減衰曲線から拡散定数を算出する方法は確立されていなかった。そこで、われわれは高い時間分解能で測定した蛍光減衰曲線を基に、FRAPの理論式を改変した式で非線形フィッティングすることでタンパク質拡散係数を求めるFDAP（fluorescent decay after photostimulation）法を開発

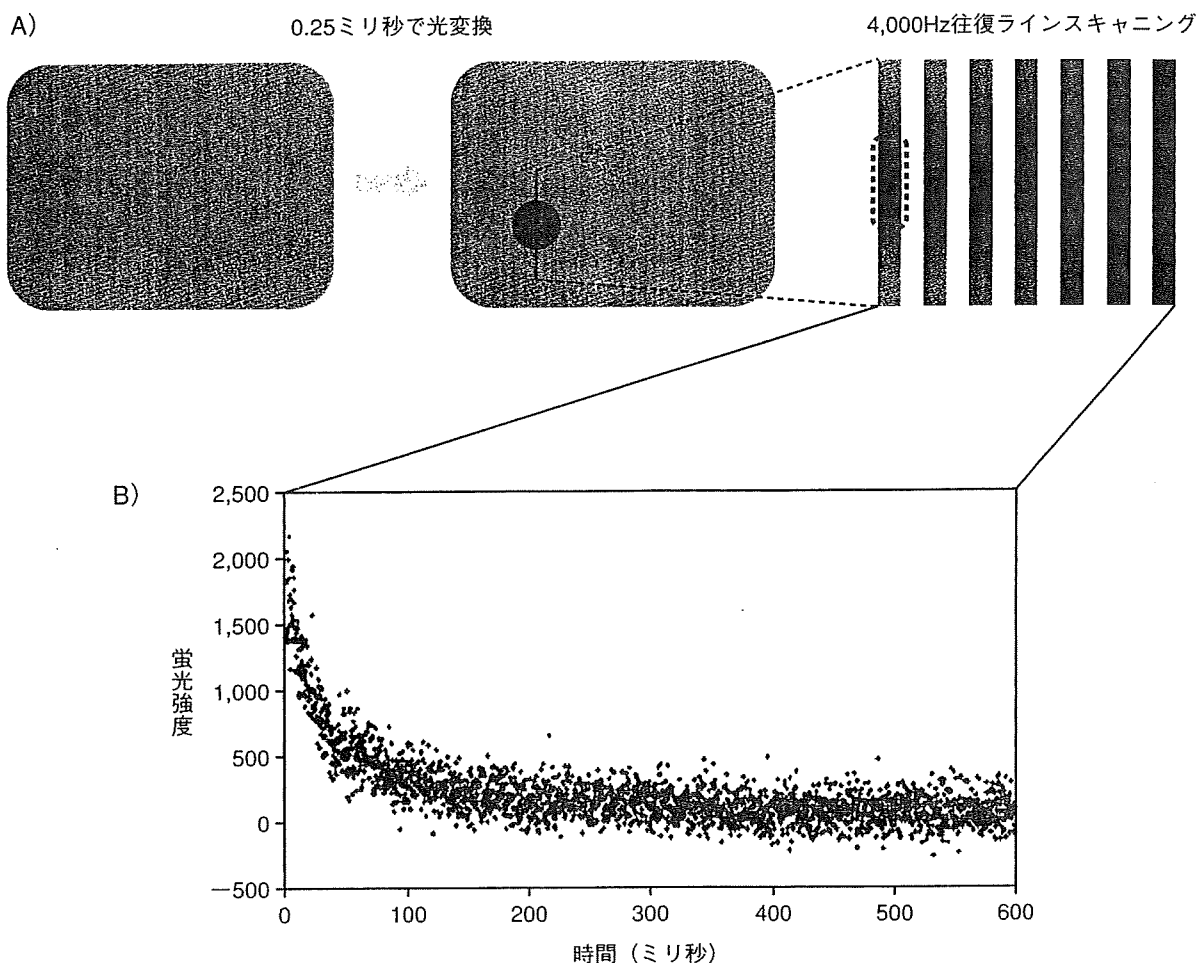


図3 FDAPの原理

A) 光変換蛍光タンパク質を発現させた細胞の局所に0.25ミリ秒の光刺激を行った後、4,000Hzの往復ラインスキャンニング走査により蛍光強度の変化を測定する。B) Aの右パネル内の点線で開いた領域の蛍光強度の時間変化をプロットすると蛍光減衰曲線が描ける

表 各測定法で求められた拡散定数の比較

蛍光タンパク質	FDAP	FRAP	FCS
	D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)	D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)	D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)
単量体	22.9 ± 3.7	34.0 ± 8.5	23.4 ± 2.5
タンデム二量体	14.1 ± 2.4	18.3 ± 6.4	16.4 ± 0.8

した⁹⁾。FDAPはレーザー共焦点顕微鏡下で回折限界程度の大きさ(直径500 μm 程度)に集光した刺激光を短時間(0.25ミリ秒)照射して光変換を行った後、およそ4,000Hzの往復ラインスキャンニングで蛍光減衰の過程を測定することを基本とする(図3)。その他にFDAP特有の工程を必要とするが、紙面の都合上割愛する。詳細は文献7を参照されたい。

FDAP法によりPhamretの水溶液中での拡散係数測定を求めると $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ であった。この値はPhamretと類似の立体構造をとっていると予想されるGFPタンデム二量体に関してFCSで得られた $50.4 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ とよく一致した。さらに、HeLa細胞内に発現するPhamretについてもGFPのタンデム二量体に関するFCSでの測定結果とよく一致した(表)。一方、

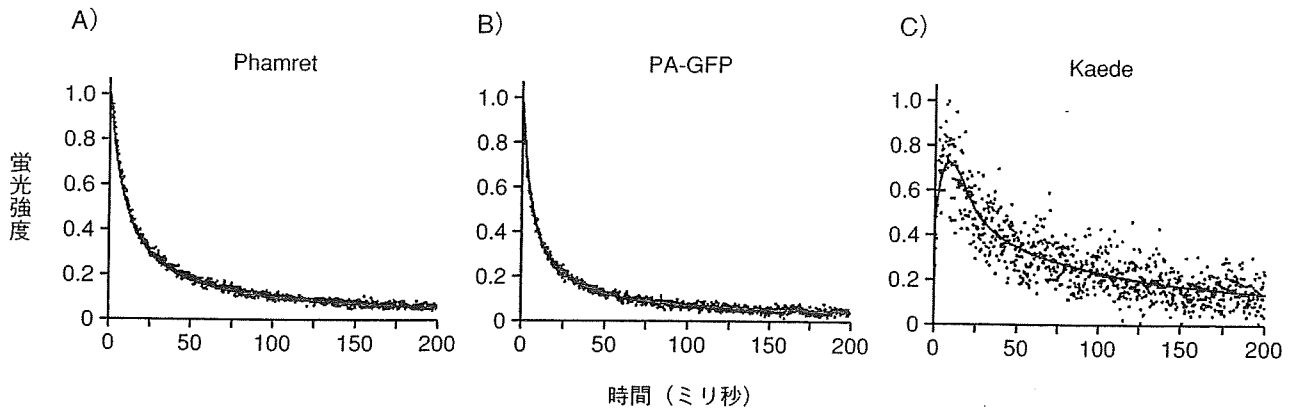


図4 FDAP 蛍光減衰カーブ (文献9より転載)

FRAP法によりPhamretやGFPタンデム二量体の拡散係数を測定すると、その値はFDAPやFCSで求めた値よりも、分散値も含め大きな値を示した(表)。この傾向はより大きな拡散係数をもつ分子を測定すると顕著になり、FRAP法では $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 程度が測定限界であると考えられた(表)。

以上の結果は、これまでFCSでなければ測定できなかった $50 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ を超える速い拡散を、より簡便迅速なFDAP法でも測定できることを示す。しかも、FDAPの全測定は200ミリ秒で終了することから、10秒程度以上の測定時間を要するFCSよりも迅速な実験が可能であり、FCSでは解析が不可能な動かない分子の割合も解析できる利点もFDAP法は有している。したがって、FDAP法はそれ1つでFRAPの測定領域からFCSの測定領域までの幅広い測定領域をカバーできる汎用性の高い方法であるといえよう。ただし、FDAPを適用するにはある程度、光変換量子効率が高いプローブを使用しなければならない。例えば、KaedeはPhamretやPA-GFPと、同じパワー密度のレーザー光で光刺激をしても十分に光変換が起こらないため、ノイズの多いFDAPカーブになってしまい、とても拡散係数算出のために利用することはできない(図4)。これはKaedeの光変換量子効率の低さに起因する。さらに、PhamretやPA-GFPとは異なり、Kaedeは光刺激直後ではなく、10ミリ秒程度遅れて蛍光強度が最大になることから、光刺激と光変換に時間的ラグが存在することもわれわれは確認している(図4、未発表データ)。これでは光変換中に分子拡散が起きてしまい、正確な拡散係数を算出することができなくな

る。われわれの経験では $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも大きな拡散係数を有する分子を測定するには、1ミリ秒以下で光変換する必要があることがわかっている。

おわりに

Phamretなどの光変換蛍光タンパク質を用いることで、タンパク質(nm)から細胞(μm)や組織(mm)レベルまでのさまざまな空間スケールの対象物を高いコントラストでハイライトすることが可能となり、適当な時間間隔でハイライト画像を取得すれば、観察対象の動態や構造変化などを視覚情報として得ることができるようになった。従来の方法よりも、簡便にタンパク質の拡散に関する定量情報も得られる。今まで以上に、生きた試料を用いて動態解析を行う研究が増えることを期待したい。ただし、十分に解析技術を熟知していなければ、全くとんちんかんなデータが出てしまったり、誤った考察をしてしまう可能性が大いにありうる。そもそも、自分が調べたいタンパク質に光変換蛍光タンパク質を融合して測定した拡散係数が、融合していないタンパク質のそれとどれくらい異なる値になるのかについて、しっかり考察することは重要である。そのためにも、大学教養課程で習ったストークス・アインシュタインの式が意味するところを復習するのはきわめて有意義であろう。

文献

- 1) 金城政孝:『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』, (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp101-109, 共立出版, 2007
- 2) 佐甲靖志:『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』,

- (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp206-220, 共立出版, 2007
- 3) 木村 宏: 『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』, (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp85-100, 共立出版, 2007
- 4) Patterson, G. H. & Lippincott-Schwartz, J.: Science, 297 : 1873-1877, 2002
- 5) Ando, R. et al.: Science, 306 : 1370-1373, 2004
- 6) Wiedenmann, J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 15905-15910, 2004
- 7) Gurskaya, N. G. et al.: Nat. Biotechnol., 24 : 461-465, 2006

- 8) Lukyanov, K. A. et al.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6 : 885-891, 2005
- 9) Matsuda, T. et al.: Nat. Methods, 5 : 339-345, 2008

<筆頭著者プロフィール>

永井健治: 1992年筑波大学第二学群生物学類卒業, '98年東京大学大学院医学研究科修了, '98年理化学研究所基礎科学特別研究員, 2001年科学技術振興機構さきがけ研究者等を経て'05年より北海道大学電子科学研究所教授. 専門は発生生物学, 多細胞生物の形態形成原理をバイオイメージングと光操作技術を用いて解き明かしたい.

PNE
PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME

蛋白質 核酸 酵素

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

新規の光変換蛍光蛋白質プローブを用いた生体イメージングと動態解析

Bioimaging and analysis of protein dynamics with a novel photoswitchable fluorescent protein probe

松田知己・永井健治

生体内において、生命現象にともない引き起こされる細胞自体やオルガネラ、蛋白質の移動を単色の蛍光蛋白質を用いたイメージングでとらえることはむずかしいが、光変換蛍光蛋白質を用いて特定の位置の細胞や蛋白質を標識し、そのパターン変化を解析することで容易にその動態を知ることができる。さらに、筆者らの開発したFDAP法により、光変換蛍光蛋白質を用いて、比較的速い動きをする蛋白質の拡散係数を求めることも可能であり、蛋白質動態の変化を視覚的側面と定量的側面から簡便に解析することができるようになった。

Key words ● 蛍光顕微鏡 ● 光変換蛍光蛋白質 ● 拡散係数

はじめに

細胞のなかで起こるさまざまな現象を生きた状態でリアルタイムに可視化し理解するアプローチは、生命現象を解明する手法の主流となり、蛍光蛋白質を用いたバイオイメージングはそのためのキーテクノロジーとして広く用いられている。そして、この蛍光蛋白質によるイメージング技術は日々進歩をつづけている。さまざまな蛍光色を発する蛋白質が開発され、その用途も、従来からある蛋白質局在化マーカーや遺伝子発現レポーターとしての使い道から広がり、蛋白質の活性化など、機能イメージングのための指示薬の開発ツールとしても活用されるようになった¹⁾。さらに、光刺激によって蛍光特性が変化する蛍光蛋白質(光変換蛍光蛋白質)も開発され、それらを用いた分子動態解析が実現している²⁾。光変換蛍光蛋白質には、蛍光をもつ生物から単離されたものもあれば、遺伝子改変によって人為的に開発されたものもあるが、その特性の変化には、蛍光を発しない(蛍光が微弱な)状態から蛍光を発する(強い蛍光を発する)状態へ変化するものと、蛍光波長がシフトするもの

とがある。このような特徴を利用して、光変換蛍光蛋白質を発現する特定の領域を光刺激によって標識し、そのパターンが変化していくようすを動画イメージとして観察することによって、また、輝度変化を解析することによって、生体内の物質の移動がかかわるさまざまな現象を理解する手がかりが得られる。

本稿では、光変換蛍光蛋白質についてその用途と種類を概説し、さらに、筆者らが遺伝子工学的・蛋白質工学的手法により開発した、FRET現象を利用した新規の光変換蛍光蛋白質であるPhamretと、それを用いた細胞・分子動態イメージングについて、事例をまじえながら紹介する。

1 光変換蛍光蛋白質の使い道

光変換蛍光蛋白質は、光刺激により標識してそれを追跡することにより、生体内で起こるさまざまなレベルでの動態の観察に用いることができる²⁾。たとえば、発生や分化の研究では“生物個体・組織レベル”のイメージングデータがその理解の大きな助けになると考えられるが、特定の細胞を標識してその移動や増殖を観察する細胞トラッキングによってそれらのデータを得ることができる(図1a)。また、脳や神経の研究においては、複雑に絡みあった神経回路における細胞集団のなかの特定の細胞に注目して観察するのに有効である。最近では、ショウジョウバエやゼブラフィッシュについて、こうした個体・組織レベルでの観察例が

Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai

北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学分野

E-mail : matsuda@es.hokudai.ac.jp

URL : <http://nano.es.hokudai.ac.jp/>

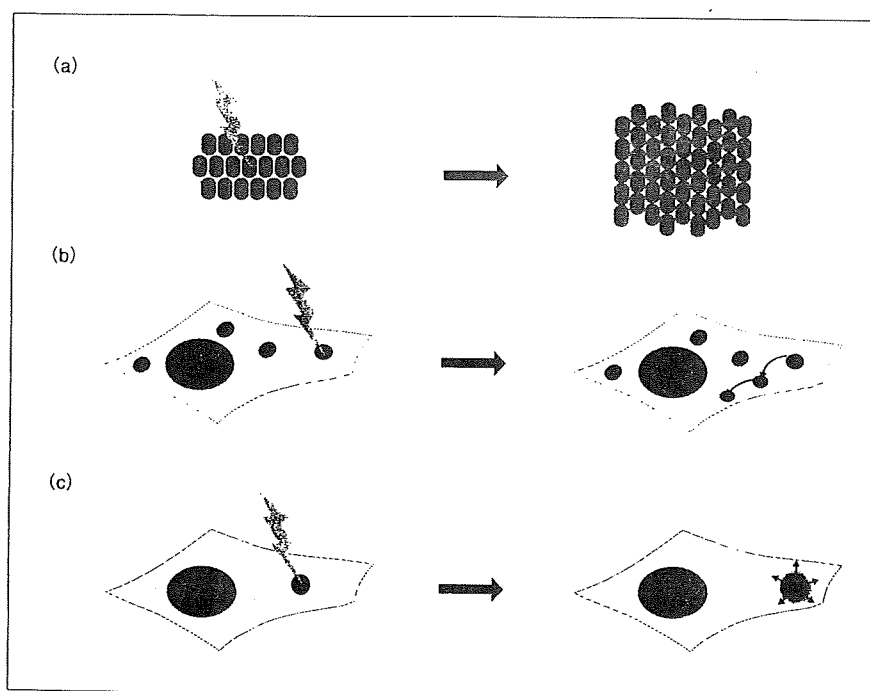


図1 光変換蛍光蛋白質を用いた生体内での分子動態解析

(a) 細胞トラッキング. 固体・組織のなかの特定の細胞を標識して、それを追跡する。

(b) オルガネラトラッキング. 細胞内の特定のオルガネラを標識して、その移動や融合を観察する。

(c) 蛋白質トラッキング. 細胞内で発現する蛋白質を限定された領域でのみ標識して、それを追跡する。いずれも、光刺激により標識された細胞・分子を赤色で示している。

増えはじめている^{3,4)}。また、“細胞レベル”においては、光変換蛍光蛋白質を発現するオルガネラのうち特定のものを標識することにより、その動く方向や速度、到達地点、さらには、融合や分裂を可視化するオルガネラトラッキングに用いることができる(図1b)。また、標的蛋白質を標識しその標識パターンの経時変化の観察から、蛋白質そのものの動態がわかる(図1c)。さらに、標識した領域内の蛍光強度の変化を数値解析すれば、蛋白質の動態を定量化した拡散係数を知ることも可能である。

光変換蛍光蛋白質が開発される以前から、こうした蛋白質の動態解析には蛍光蛋白質のブリーチング(光退色)を原理とするFRAP (fluorescence recovery after photobleaching, 光退色後蛍光回復)法⁵⁾が用いられてきたが(Column), FRAP法では領域外部からの蛍光分子の流入という間接的な効果のみをみているので、標識した分子が別の場所で蓄積するような現象を可視化することはできない。また、光変換に比べてブリーチングは大きな光エネルギーを必要とするため、細胞にダメージをあたえる心配がある。さらに、動きの速い分子の蛋白質拡散係数測定の際には、ブリーチングの過程で起こる拡散により正確な拡散係数を求めることができない⁶⁾。光変換蛍光蛋白質はこれらの問題点をクリアすることが可能であるため、分子動態を解析するツールとして、今後、不可欠なものになっていくのではないかと考えられる。

光変換蛍光蛋白質は分子動態解析への応用のほかに、超解像顕微鏡観察法であるPALM (photoactivated localization microscopy) 法やRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transition) 法でも用いられている^{7,8)}。これらの方法は発展途上で、まだ一般のユーザーが簡単に導入できる段階ではなく、今後の発展が期待される。

II 光変換蛍光蛋白質の種類と性質

光変換蛍光蛋白質には、光刺激により暗い状態から明るい状態へと変化する光活性化蛍光蛋白質(photoactivatable fluorescent protein; PAFP)と、光刺激により蛍光特性が変化して異なる波長の蛍光を発するようになる色変換蛍光蛋白質(photoconvertible fluorescent protein; PCFP)とがある²⁾。さらに、光活性化蛍光蛋白質は2種類に分類できるため、大きく3つの種類に分類することができる(表1)。これらについて、それぞれ代表的なものを紹介する。

1. 不可逆的な光活性化蛍光蛋白質

光活性化が不可逆的に起こる蛍光蛋白質としては、細胞イメージングのため実用的な光変換蛍光蛋白質として最初に開発されたPA-GFP (photoactivatable green fluorescent protein)がその代表例である。PA-GFPは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)に由来するGFPの203番目のチ

ロシン残基をヒスチジン残基に変換することによってGFPがもともと持っていた光異性化能を増強させた変異体で、刺激光により光活性化されて吸収ピークの波長が400 nmから480 nmへとシフトする⁹⁾。活性化前は480 nmに吸収をもたないため、光活性化の前後で480 nmで励起したときの517 nmの緑色蛍光強度は100倍も増加する。

2. 可逆的な光活性化蛍光蛋白質

活性化と不活性化をくり返すことのできる蛍光蛋白質の代表例は、サンゴ由来のDronpaである¹⁰⁾。活性化に用いる紫(外)光とは波長の異なる強い青色の刺激光をあたえてやることにより積極的に不活性化させることができるため、蛍光のオンとオフを自由に制御することが可能である。細胞内では緑色の蛍光を発する活性化状態で発現する。Dronpaはオンとオフのスイッチングの操作性のよさから、PALM法やRESOLFT法といった超解像顕微鏡技術への応用が積極的に試みられている^{11,12)}。

3. 色変換蛍光蛋白質

色変換蛋白質は刺激光の照射により蛍光特性が変化し、照射前とは別の波長の蛍光を発するようになるものである。光活性化蛍光蛋白質では光を発しない不活性化状態があるのに対して、刺激前と刺激後の両方の状態で蛍光観察を行なうことができる。すなわち、いずれの状態でも分子の発現している場所を容易に知ることができ、全体の発現パターンのなかで標識した分子がどのように移動していくのかを可視化することができる。青色から緑色に変化するものとしては、*Aequorea victoria*とは別のオワンクラゲ(*Aequorea coerulea*)由来のPS-CFPがある。緑色から赤色に変化

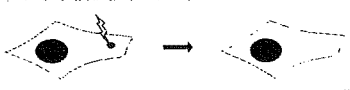
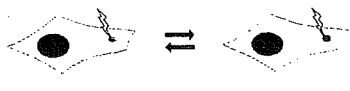
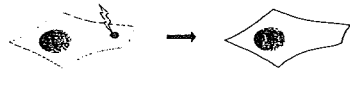
するものとしては、サンゴ由来のEosFP, KikGR, Kaede, Dendraがある²⁾。

光変換蛍光蛋白質は、発色団が受け取った刺激光のエネルギーによって、脱炭酸(PA-GFPやPS-CFP)や蛋白質主鎖の切断(Kaede)、あるいは、光異性化(Dronpa)などの反応が引き起こされることで発色団の周囲の化学環境が変化し、その結果、蛍光特性が変化する²⁾。刺激光としてはおもに紫(外)光(波長400 nm付近)が用いられるため生体へのダメージが心配されるが、ほとんどの場合、1 W/cm²程度の刺激光を数秒間照射するだけで光変換を起こすことができるため、さほど問題とはならない。可視光領域での刺激光を用いることが可能であるものもあり、それらは紫外線によるダメージを受けやすい試料の観察に有効である。光変換蛍光蛋白質でも多くのものは単量体化された変異体が作製されているが、単量体の開発に成功していないものを使用する際には、標的蛋白質が機能を失ったり、局在化が変化したり、あるいは、凝集体を形成したりすることがあるため注意が必要である。

■ 新規の色変換蛍光蛋白質 Phamret

これまでに開発された色変換蛍光蛋白質では、刺激光の照射により蛍光波長が変化すると同時に、励起光の波長の変化も引き起こされていた。したがって、色変換前と色変換後の両方の状態の蛍光観察をするためには、波長の異なる2種類の励起光を必要とした。細胞内での速い分子動態を観察する際には、2波長の蛍光像をフィルター交換しながら交互に取得すると、2色の蛍光画像のあいだの時間的ず

表1 代表的な光変換蛍光蛋白質とその特性

	蛍光の変化	複合体形成	刺激光の波長(nm)
 不可逆的な光活性化蛍光蛋白質 PA-GFP PA-mRFP1	無蛍光→緑色	単量体	405
	無蛍光→赤色	単量体	365
 可逆的な光活性化蛍光蛋白質 KFP1 Dronpa	無蛍光→赤色	4量体	543
	無蛍光→緑色	単量体	488/405 活性化/不活性化
 不可逆的な色変換蛍光蛋白質 PS-CFP mEosFP KikGR Kaede Dendra	青色→緑色	単量体	405
	緑色→赤色	単量体	405
	緑色→赤色	4量体	405
	緑色→赤色	4量体	365, 405
	緑色→赤色	単量体	488, 405

れが問題となる。共焦点レーザー顕微鏡を用いて同時に2波長励起・蛍光測定を行なったとしても、励起光レーザー間の共焦点領域のずれを完全に一致させるのは困難なため、蛍光画像間の空間的なずれはまぬがれない。さらに、2波長励起を基本とするため、照射する励起光の強度が1波長励起に比べて約2倍になることから、光照射に弱い細胞をイメージングする場合には光損傷を十分に考慮しなければならない。このような問題点に対応できる新たなプローブとして、筆者らは1波長励起で2波長の蛍光を観察することのできる新規の色変換蛍光蛋白質、Phamret (photoactivation-mediated resonance energy transfer) を開発した¹³⁾。

1. Phamretの色変換メカニズム

Phamretは、2つの蛍光蛋白質、mSECFP (monomeric super enhanced cyan fluorescent protein) とPA-GFPとを直列につないで作製されたキメラ蛋白質で、PA-GFPを活性化する前は458 nmの励起光をあてるとmSECFPが青色の蛍光を発する。405 nmの刺激光を照射してPA-GFPを活性化すると、mSECFPの励起エネルギーはFRETによって無輻射的にPA-GFPに移動し、PA-GFPから緑色の蛍光が発せられる。したがって、色変換前の青色と変換後の緑色の蛍光画像を458 nmの1波長の励起光で取得することができる(図2)。Phamret開発の際には、mSECFPと

PA-GFPを結ぶリンカーの長さを変化させ、最適なFRET効率をもつものを選び出している。

2. Phamretを用いた動態解析の例

これまで、Phamretをさまざまな蛋白質、たとえば、ヒストン2B、 β アクチンや核小体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの局在化シグナルと融合し、HeLa細胞内で発現させ観察を行なったところ、局在化と色変換のいずれもが確認された。ミトコンドリア局在化シグナル、あるいは、ヒストン2Bを融合させたものについては、さらに動態解析を行なった。

A. ミトコンドリア融合

PhamretのN末端側にCox IV蛋白質由来のミトコンドリア局在化シグナルを融合したmt-PhamretをHeLa細胞内に発現させた。生細胞内に分布するミトコンドリアのうちの一部を光変換させ観察したところ、色変換前のmt-Phamretをもつミトコンドリアチューブと、色変換後のmt-Phamretをもつものが融合するようすが観察された(図3a)。さらに、融合したミトコンドリアのマトリックス内において色変換したmt-Phamretが拡散していくようすを可視化することができ、その結果、融合後にはマトリックス間の隔壁も取り払われていて物質が自由な移動をすることが示された(図3a)。

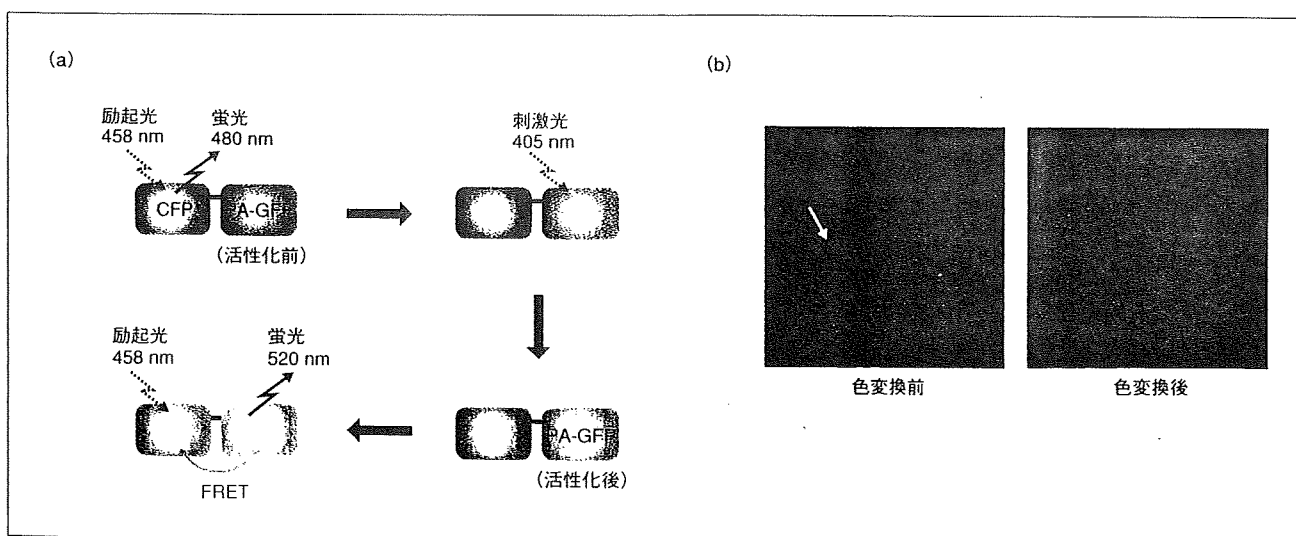


図2 Phamretの色変換

(a) Phamretの色変換メカニズム。Phamretは、CFP (mSECFP)とPA-GFPを直列に結合して作製された。PA-GFPを活性化させると、458 nmの光で励起されたCFPのエネルギーがFRETにより移動して、PA-GFPより緑色の蛍光が発せられる。したがって、色変換前の青色の蛍光と、色変換後の緑色の蛍光の、どちらも458 nmの励起光で観察することができる。

(b) Phamretを発現するHeLa細胞における1細胞の色変換。矢印で示した細胞の細胞質に刺激光(405 nm)を照射して色変換させた。青色の蛍光には青色、緑色の蛍光には赤色の擬似カラーを割り当て、合成像として表示している。[文献13より転載、一部改変]

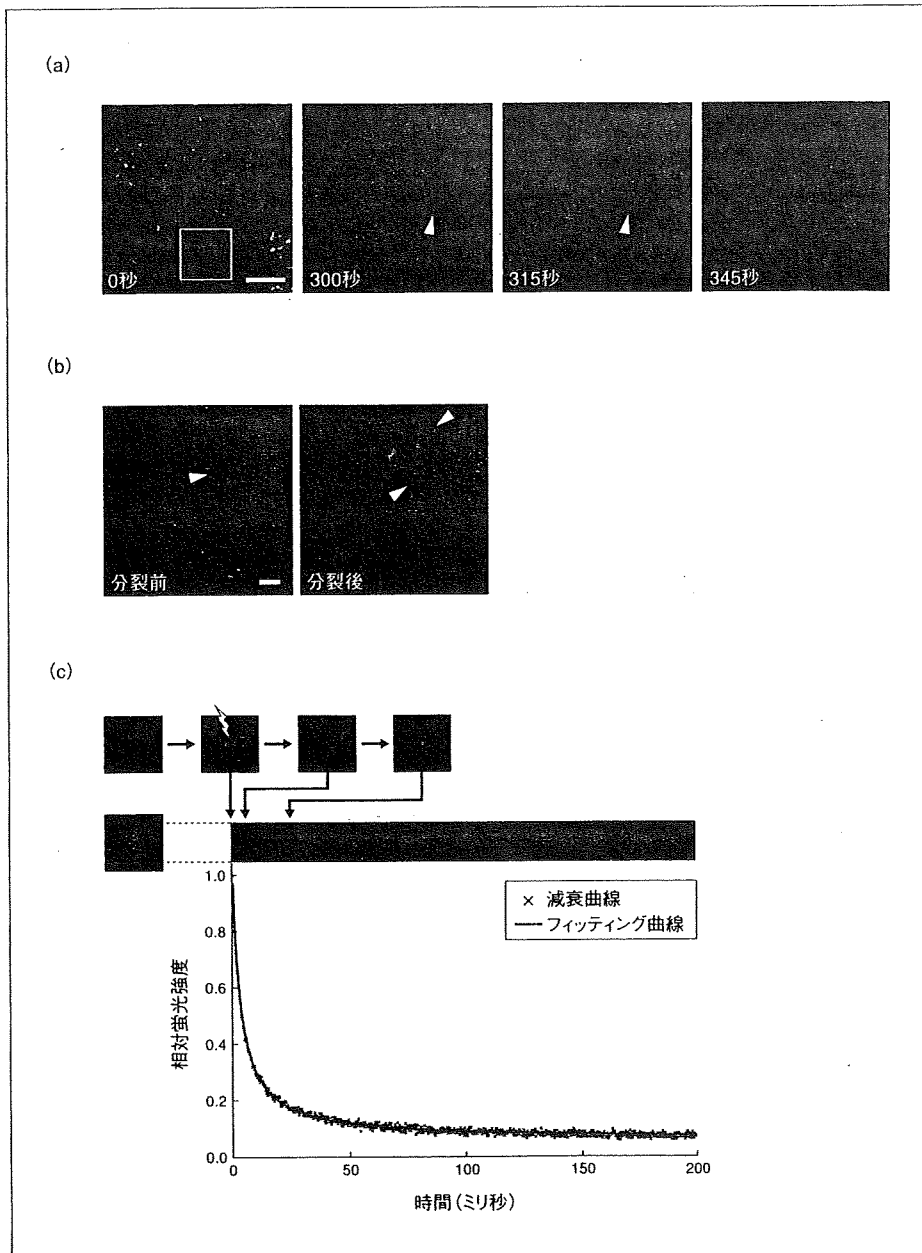


図3 Phamretを用いた動態解析

(a) ミトコンドリア融合の観察. HeLa細胞中において mt-Phamret を発現するミトコンドリアの一部を色変換させ (0 秒, 以降は点線の内部の画像を拡大して表示), その動態を観察した. 300 ~ 315 秒のあいだで色変換を受けたミトコンドリア (赤色) と受けていないミトコンドリア (白色) の融合がみられ, 315 ~ 345 秒のあいだでは色変換を受けた分子のマトリックス内の移動を色の拡散としてみる事ができた.

(b) 分裂時のヒストン 2B の分配の観察. HeLa 細胞中において H2B-Phamret を発現する核の半分の領域を分裂前に色変換させ (白色の矢じり), 分裂後まで観察をつづけると, 娘細胞でも核の半分の領域に色変換させた分子が分布しており, パターンが保存されているのが観察された.

(c) Phamret 蛋白質の溶液中での FDAP 法による拡散係数の測定. 溶液中で 0.25 ミリ秒の刺激光により増大した緑色の蛍光について, その拡散による減少をプロットし (x), それに対してモデル式をフィッティングさせて (黄緑色の線), 拡散係数 $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ を得た.

[文献 13 より転載, 一部改変]

B. 細胞分裂時のヒストン 2B の分布

Phamret の C 末端側にヒストン 2B を融合した H2B-Phamret を HeLa 細胞内に発現させた. 核内に発現した H2B-Phamret を細胞分裂前に半円状に色変換させてタイムラプスイメージングを行なったところ, 分裂後においても, 核の半分の領域に色変換した H2B-Phamret が分布しており, パターンが保存されるようすを観察することができた (図 3b). これまでのヒストン 2B の動態解析では, 2 つの異なる色の蛍光蛋白質を融合させたものを共発現させ片方をブリーチングしてパターン変化を解析していたが, Phamret

を用いることにより, 細胞の生育や核内構造への悪影響をあたえる強いエネルギー ($10 \text{ W}/\text{cm}^2$ 以上) であるブリーチング光の照射を行なうことなく, 圧倒的に弱いエネルギーの刺激光で同様の解析結果が示された.

IV 光変換蛍光蛋白質を用いた拡散係数測定法: FDAP 法

細胞内で自由な状態で存在する蛋白質は, それぞれが固有の速度をもって動いている. それらが完全に自由な状態